

Università di Pisa

Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica

Tesi di specializzazione

Il “targeting” del sindecano-1, molecola coinvolta nel processo di “vasculogenic mimicry”, potenzia l’ efficacia terapeutica dell’ immunocitochina L19-IL2 in un modello sperimentale murino di melanoma umano.

Targeting Syndecan-1, a molecule implicated in the process of vasculogenic mimicry, enhances the therapeutic efficacy of the L19-IL2 immunocytokine in human melanoma xenografts.

Relatore: Prof. ssa Maria Cristina Mingari

Candidata: Dott. ssa Paola Orecchia

Anno 2016

RIASSUNTO

La terapia anti-angiogenica nei tumori solidi finora non ha condotto ai benefici clinici desiderati, probabilmente a causa della complessità del processo neo-angiogenico, uno dei meccanismi che sta alla base della crescita dei tumori solidi. Un ruolo importante è svolto dalla “vasculogenic” o “vascular” mimicry (VM), un fenomeno in cui le cellule tumorali più aggressive sono in grado di formare una rete vascolare alternativa, indipendente dal processo di neo-angiogenesi che coinvolge le cellule endoteliali. In questo studio abbiamo osservato che in linee cellulari di melanoma umano con fenotipo vascolare e caratteristiche di staminalità e in tumori di melanoma umano si ha la co-espressione del sindecano-1 con marcatori di VM, come le molecole CD144 e VEGFR-2. Abbiamo dimostrato tramite esperimenti *in vitro* che utilizzando l’ anticorpo ricombinante umano OC-46F2, specifico per il sindecano-1, le cellule di melanoma umano perdono la loro capacità di formare strutture tubulari simil-vascolari.

E’ stato inoltre osservato che in un modello sperimentale di melanoma umano indotto in topi NOD-SCID la terapia combinata, utilizzando l’ anticorpo umano ricombinante OC-46F2 e l’ immunocitochina L19-IL2, specifica per l’ isoforma EDB della fibronettina (B-FN), ha avuto come effetto la completa inibizione della crescita tumorale nel 71% dei topi trattati fino al giorno 90 dall’impianto del tumore con differenze statisticamente significative rispetto ai gruppi trattati con OC-46F2 o L19-IL2 come monoterapia. Inoltre, nei tumori espuntati da topi trattati con OC-46F2 come monoterapia o in combinazione con L19-IL2, abbiamo osservato una drastica diminuzione della densità vascolare e la perdita di strutture tubulari simil-vascolari. Questi risultati per la prima volta conferiscono al sindecano-1 un ruolo nella “vascular mimicry” del melanoma e indicano che il “targeting” del sindecano-1 combinato alla B-FN potrebbe essere una terapia molto promettente per migliorare il trattamento del melanoma metastatico umano.

ABSTRACT

Anti-angiogenic therapy of solid tumors has until now failed to produce the long lasting clinical benefits desired, possibly due to the complexity of the neoangiogenic process. Indeed, a prominent role is played by “vasculogenic” or “vascular” mimicry (VM), a phenomenon in which aggressive cancer cells form an alternative microvascular circulation, independently of endothelial cell angiogenesis. In this study we observed, in melanoma patient cell lines having vasculogenic/stem-cell like phenotype and in melanoma tumors, the syndecan-1 co-expression with VM markers, such as CD144 and VEGFR-2. We show that melanoma cells lose their ability to form tubule-like structures *in vitro* after blocking syndecan-1 activity by the specific human recombinant antibody, OC-46F2. Moreover, in a human melanoma xenograft model, the combined therapy using OC-46F2 and L19-IL2, an immunocytokine specific for the tumor angiogenic-associated B-fibronectin isoform, led to a complete inhibition of tumor growth until day 90 from tumor implantation in 71% of treated mice, with statistically significant differences compared to groups treated with OC-46F2 or L19-IL2 as monotherapy. Furthermore, in the tumors recovered from mice treated with OC-46F2 either as monotherapy or in combination with L19-IL2, we observed a dramatic decrease of vascular density and loss of VM structures. These findings indicate for the first time a role of syndecan-1 in melanoma VM and that targeting syndecan-1, together with B-FN, could be promising in improving the treatment of metastatic melanoma.

Parole chiave: “Vasculogenic/Vascular” mimicry, Angiogenesi, scFv OC-46F2 anti Sindecano-1, terapia combinata melanoma, immunocitochina L19-IL2

Keywords: Vasculogenic/Vascular mimicry, Angiogenesis, scFv OC-46F2 anti Syndecan-1, Melanoma combined therapy, immunocytokine L19-IL2

INTRODUZIONE

Data la premessa importante che in tutti i tumori solidi, compreso il melanoma, i vasi sanguigni sono indispensabili per la crescita del tumore e delle metastasi, le terapie anti-angiogeniche si sono in origine sviluppate sul concetto di “starvation”, ossia di privare il tumore primario e metastatico del nutrimento necessario per crescere bloccando la formazione di nuovi vasi [1-6].

Tuttavia, mentre i farmaci anti-angiogenici sono stati effettivamente in grado di ridurre l’angiogenesi, le terapie non hanno prodotto i benefici desiderati e prolungati nel tempo, mostrando vari limiti di utilizzo. Questo probabilmente a causa della complessità e della numerosità dei meccanismi coinvolti nella progressione tumorale e regolati dal microambiente tumorale [3, 7-9].

Il melanoma metastatico è uno dei tumori con più elevata mortalità e purtroppo i progressi fatti per il suo trattamento sono molto limitati [10-13]. Recentemente L19-IL2, un immunocitochina specifica per l’ isoforma EDB della fibronettina associata a neo angiogenesi in grado di localizzarsi selettivamente sui vasi tumorali, è stata utilizzata in trials clinici di fase II su gruppi di pazienti con melanoma metastatico in combinazione con dacarbazine o con L19-TNF α . L’ utilizzo di L19-IL2 ha condotto a risultati molto incoraggianti [10, 14-18].

In molti tumori incluso il melanoma oltre all’ angiogenesi esistono altri meccanismi che sono in grado di fornire l’ apporto necessario di nutrienti e sangue per la crescita del tumore. Uno di questi è la “vascular mimicry” (VM), un processo tramite il quale le cellule più aggressive del tumore sono in grado di formare delle strutture tubulari simil-vascolari senza il coinvolgimento delle cellule endoteliali [19, 20].

Si sta sempre di più affermando l’ ipotesi che per la cura dei tumori solidi le terapie più efficaci siano quelle in grado di colpire più targets tumorali contemporaneamente. I markers di VM potrebbero essere un buon target per questo scopo [7-9, 20].

Molte proteine di adesione e di membrana come MMP1/2, VEGFR-1/2, HIF-1, Nodal, FAK, EpHA2 and VE-cadherin (CD144), sembrano svolgere un ruolo cruciale nel processo di VM in molti tumori solidi come il melanoma e il glioma [20-24]. La VE-cadherin, espressa dalle cellule endoteliali, è anche espressa nelle cellule di melanoma altamente aggressive e la sua soppressione inibisce la VM, facendo di questa proteina uno dei migliori marker di VM [25]. Studi recenti hanno riportato che molti markers di “cancer stem cell” (CSC) come CD133, ALDH1 e CD44 sono coinvolti nella VM [20].

Il sindecano-1 (CD138), uno dei quattro membri della famiglia del sindecano, è un proteoglicano di membrana con catene di heparan (HS) e chondroitin sulphate (CS). E’ espresso principalmente sulle cellule epiteliali [26], ma anche sui linfociti B a specifici stadi di differenziamento [27].

Recentemente si è visto che è anche espresso sulle cellule di melanoma [22] e che la sua espressione correla con l' aumento del loro potenziale metastatico [28]. Le catene degli HS sono responsabili dell' interazione del sindecano-1 con vari fattori solubili, come fattori pro-angiogenici come il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e il Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2), molecole cellulo-associate e proteine della matrice extracellulare (ECM) [26, 29, 30]. Inoltre, il VEGF e il sindecano-1 “sheddato” ad opera di metalloproteasi formano dei complessi proteici ancorati alla matrice tumorale che sono in grado di attivare le integrine e i recettori del VEGF presenti sulle cellule endoteliali, stimolando così l' angiogenesi tumorale [31]. Varie pubblicazioni inoltre suggeriscono che il sindecano-1 potrebbe essere coinvolto nella stimolazione delle CSC o delle “tumor initiating cells” (TIC) e che questo potrebbe essere una causa della resistenza alle terapie [30] (e ref interne).

Abbiamo recentemente dimostrato che il sindecano-1 potrebbe essere un potenziale target terapeutico nel melanoma e nel carcinoma ovarico. Infatti, esperimenti preclinici di terapia in un modello sperimentale murino di melanoma umano e di carcinoma ovarico umano, hanno mostrato che l' scFv OC-46F2, un anticorpo ricombinante umano specifico per la porzione extracellulare del sindecano-1, era in grado di inibire la maturazione vascolare e la crescita tumorale [22].

In questo studio si dimostra tramite esperimenti *in vitro* e *in vivo* che l' anticorpo OC-46F2 è in grado di inibire la VM delle cellule di melanoma e la formazione di strutture vascolari da parte delle cellule endoteliali. Per la prima volta è stato quindi osservato che il sindecano-1 è coinvolto nella VM del melanoma. Inoltre abbiamo osservato che la somministrazione combinata dell' anticorpo OC-46F2 e dell' immunocitochina L19-IL2 ha come effetto, nel 71% dei topi trattati, la completa inibizione della crescita del tumore fino al giorno 90 dall' impianto del tumore sottocute. Al giorno 124 nel gruppo L19-IL2/OC-46F2 la sopravvivenza degli animali era del 64% mentre quella del gruppo di topi trattati con L19-IL2 era lo 0%. Questi risultati suggeriscono quindi che la terapia combinata potrebbe migliorare l' efficacia terapeutica sia dell' anticorpo OC-46F2 sia dell' immunocitochina L19-IL2 somministrate in monoterapia.

RISULTATI

Caratterizzazione di cellule di melanoma umano metastatico con fenotipo vascolare

Le linee cellulari di melanoma SKMEL28, MV3 e dieci linee di melanoma isolate da pazienti, tutte in grado di esprimere in membrana il sindecano-1, formavano strutture simil-vascolari se fatte crescere su Matrigel. Tutte le linee sono state iniettate o sottocute o nella vena caudale di topi immunodepressi NOD-SCID per verificare rispettivamente la loro capacità di indurre la crescita del melanoma sottocute o la formazione di metastasi polmonari. Come riassunto nella tabella 1, SKMEL28, MV3, MeTA e MeMO erano in grado di formare strutture simil-vascolari sul Matrigel e sei su sette linee da pazienti erano in grado di indurre la crescita del melanoma sottocute come la linea SKMEL28. Inoltre, come precedentemente descritto per la linea di melanoma metastatico MV3 [32], SKMEL28 e le due linee MeTA e MePA inducevano la formazione di metastasi al polmone. I noduli metastatici sono stati identificati su sezioni di polmone utilizzando l' anticorpo anti Ki67 umano specifico per cellule umane in proliferazione (Fig. S1 A supplementare). Inoltre in accordo con quanto descritto in letteratura [33], abbiamo osservato che linee di melanoma con un forte potenziale metastatico come SKMEL28, MePA, MeTA e MV3 non erano in grado di esprimere c-Kit (CD117), al contrario di MeMI che esprimeva c-Kit (Tabella 1, Fig. S1 B e S2 supplementare) e non formava metastasi. Tutte le linee di melanoma sono state analizzate per la loro espressione di superficie dei markers di staminalità CD133/1 e CD271. Mentre CD133/1 era espresso solo su MeTA, la maggior parte delle linee con fenotipo vascolare esprimevano il CD271 (Fig. S2 supplementare). Tutte le linee di melanoma esprimevano a livello di mRNA i markers tipici delle “cancer stem cell” come CD44, ALDH1 and Nodal (dati non mostrati).

In esperimenti oggetto di precedente pubblicazione (Orecchia et al. 2013), era stato osservato che la molecola VEGFR-2 era in grado di co-localizzare con il sindecano-1 in melanomi umani indotti in topi NOD-SCID. Per indagare sul ruolo del recettore VEGFR-2 nella “vascular mimicry”, abbiamo utilizzato lo specifico inibitore del VEGFR-2, SU1498, in esperimenti *in vitro* su Matrigel utilizzando cellule di melanoma umano. Come mostrato in figura 1A SU1498 inibisce la formazione di strutture tubulari da parte delle cellule di melanoma umano (b) al contrario di quanto accade nei controlli se le cellule sono trattate con il DMSO (c) o non trattate (a).

Inoltre, tramite immunofluorescenza su sezioni di melanoma SKMEL28 indotto in topi NOD/SCID, SKMEL28/NOD SCID, abbiamo mostrato che il VEGFR-2 (Fig. 1B, a) colocalizza con il CD144 (Fig. 1B, b).

Sono state scelte tre linee cellulari di melanoma da paziente (MeMI, MePA and MeTA) e la linea SKMEL28 e abbiamo osservato che erano negative per l' espressione del marker delle cellule

endoteliali CD31 (Fig. 2A e tabella supplementare S1), ma esprimevano il CD144 e il VEGFR-2 (Fig. 2B, 2C e tabella supplementare S1). Questi risultati dimostrano che le strutture tubulari formate dalle cellule di melanoma non sono di origine endoteliale. Nella figura 2D, utilizzando l' anticorpo umano ricombinante OC-46F2 specifico per il sindecano-1 (CD138), si può osservare la colocalizzazione del sindecano-1 con il CD144 (a-c; g-i) e il VEGFR-2 (d-f; l-n) nelle cellule SKMEL28 e nelle cellule endoteliali TIME.

Nella figura 3A tramite immunofluorescenza su sezioni di melanoma SKMEL28/NOD-SCID, si mostra che l' anticorpo OC-46F2 era in grado di riconoscere vasi di origine umana positivi con l' anticorpo specifico per la proteina umana CD144, come indicato dalle teste di freccia.

Inoltre, è stato mostrato che il sindecano-1 colocalizza con il VEGFR-2. Gli stessi risultati li abbiamo osservati su sezioni di melanoma MeTA indotto in topi NOD SCID e su sezioni di biopsie di melanoma metastatico da diversi pazienti (Fig. 3B). Tutti questi risultati suggeriscono che il sindecano-1 è presente in strutture tubulari simil vascolari che esprimono i markers di VM, CD144 e VEGFR-2.

Espressione di sindecano-1, CD144 e VEGFR-2 in un modello sperimentale di metastasi polmonari di melanoma umano

Al fine di studiare il coinvolgimento del sindecano-1 umano nel processo di metastatizzazione, sono state eseguite delle immunofluorescenze su sezioni di polmoni prelevati da topi NOD-SCID iniettati in vena con cellule di melanoma umano MeTA. Per riconoscere specificamente cellule umane abbiamo utilizzato l' anticorpo anti NuMA e abbiamo osservato una marcata espressione di sindecano-1 (Fig. 4A, a) e VEGFR-2 (Fig. 4A, b) in cellule di melanoma NuMA positive

Questi dati sono in accordo con i risultati di qRT-PCR, nei quali si osserva un aumento significativo dell' espressione di mRNA del sindecano-1 in cellule MeTA isolate dalle metastasi dei polmoni (MeTA met) rispetto alle cellule iniettate, così come accade per VEGFR-2 e CD144 (Fig. 4B). In Figura 4A utilizzando OC-46F2 e l' anticorpo anti CD144 (d-f), si osserva la presenza del sindecano-1 in strutture tubulari di origine umana. Tutti i noduli metastatici analizzati erano negativi per l' espressione della proteina umana CD31 (c). Inoltre, le strutture tubulari positive per OC-46F2 erano negative per il CD31 murino (g-i). La Figura 4C mostra le immagini in tempo reale della migrazione di cellule di melanoma MeTA-GFP lungo i vasi endoteliali (a), e la capacità delle cellule tumorali di localizzarsi lungo la superficie esterna dei tubuli vascolari, (b,c).

L' anticorpo umano ricombinante anti sindecano-1, OC-46F2, inibisce i processi di “vascular mimicry” e angiogenesi in esperimenti *in vitro* e *in vivo*

Per valutare la capacità dell' anticorpo OC-46F2 di inibire i processi di “vascular mimicry” e angiogenesi, sono stati condotti esperimenti *in vitro* su Matrigel usando SKMEL28, MeTA e TIME. Come mostrato in Figura 5A, le cellule di melanoma SKMEL28 transfettate con scFv OC-46F2 non erano in grado di formare strutture tubulari dopo 48 ore di incubazione su Matrigel (b) al contrario delle stesse cellule transfettate con il vettore vuoto (a) o con un anticorpo di controllo (c) che formavano strutture ben organizzate. Lo stesso effetto inibitorio è stato osservato aggiungendo alle cellule l' anticorpo scFv OC-46F2 alla concentrazione di 200 µg/ml. Infatti l' anticorpo OC-46F2 (Fig. 5B, b; 5C, b) inibiva la formazione *in vitro* di strutture tubulari da parte di SKMEL28 e MeTA (Fig. 5B) e di strutture vascolari da parte delle cellule endoteliali TIME (Fig. 5C) rispetto alle cellule trattate con un anticorpo di controllo (Fig. 5B, c; 5C, c) o le cellule non trattate (Fig. 5B, a; 5C, a).

Nessuna inibizione o una minima riduzione nella formazione dei tubuli vascolari era osservata dopo l' aggiunta di L19-IL2 a SKMEL28 (5B, right column bar graph) o a TIME (5C).

Inoltre tramite il test *in vivo* “Matrigel plug assay”, è stato valutato l' effetto anti-angiogenico di OC-46F2 in rapporto alla dose iniettata (Fig. 5D, a). Come mostra la Figura 5D, b, i plug di Matrigel prelevati da topi trattati con OC-46F2 non mostravano vascolarizzazione FGF2-indotta.

Questi risultati suggeriscono che il sindecano-1 è coinvolto sia nella formazione dei tubuli simil-vascolari da parte di cellule di melanoma sia di strutture vascolari da parte di cellule endoteliali. Inoltre poichè l' anticorpo OC-46F2 riconosce un epitopo del “core protein” del sindecano-1, come riportato in figura supplementare S3, l' ipotesi che le catene di GAG della molecola non siano implicate nei vari meccanismi è molto convincente.

Efficacia terapeutica di OC-46F2 in combinazione con L19-IL2 in un modello sperimentale di melanoma umano

E' stato riportato che l' anticorpo ricombinante umano scFv OC-46F2 specifico per la porzione extracellulare del sindecano-1, ha un' attività anti tumorale poichè riduce la crescita tumorale e la maturazione vascolare in modelli murini di melanoma umano e carcinoma ovarico[22]. In accordo con quanto già pubblicato, [15, 22] è stato osservato che gli anticorpi scFv OC-46F2 e L19, un scFv specifico per l' isoforma B della fibronectina, erano in grado di localizzarsi sia a livello della ECM sia dei vasi tumorali (Supplementary Fig. S4). E' stato inoltre osservato che OC-46F2 colorava molti vasi all' interno del tumore che erano negativi con L19. Infatti come mostrato in Figura 6 (a-c) e negli ingrandimenti (d-f, g-i), OC-46F2 e L19 colorano la maggior parte dei vasi nel modello

sperimentale SKMEL28/NOD SCID; tuttavia molti vasi erano positivi solo con OC-46F2 (Fig. 6, d-f, g-i).

Per verificare se una terapia combinata con un' altra molecola in grado di localizzarsi selettivamente nelle strutture tumorali, potesse migliorare l' efficacia anti tumorale di scFv OC-46F2, è stata scelta l' immunocitochina L19-IL2, formata da scFv L19 e dalla citochina IL2 [16, 34, 35].

Gli esperimenti di terapia combinata sono stati condotti utilizzando il modello sperimentale SKMEL28/NOD SCID. In un esperimento preliminare di terapia la dose utilizzata era di 40 µg per OC-46F2 e 40 µg per L19-IL2 (date in combinazione) ad ogni somministrazione. Il protocollo terapeutico è descritto nei Materiali e Metodi e riassunto in fig. 7A. Come mostrato in Figura 7B fino a 35 giorni dall' impianto sottocute di cellule di melanoma si osservava una riduzione della crescita del tumore nel 100% dei topi trattati rispetto agli animali non trattati. Dal giorno 39, sei su tredici topi (40%) mostrava una crescita del volume dei tumori, perciò è stato somministrato un secondo ciclo di terapia seguendo il protocollo terapeutico riassunto in fig. 7A. Come mostrato in alto a destra della figura 7B, i volumi dei topi trattati diminuivano in tutti e sei i topi trattati tra il giorno 49 e il giorno 56 quando ricevevano solo OC-46F2. Gli altri sette topi (60%) non hanno ricevuto alcun trattamento. La “two-tailed p value” dei due gruppi al giorno 46 e 49 dall' impianto del tumore erano rispettivamente molto significativa (p value= 0.0058) e significativa (p value=0,0192). In questo esperimento preliminare il gruppo di topi trattati con la terapia combinata mostrava un ritardo di 60 giorni nella crescita del tumore rispetto al gruppo di controllo che non riceveva terapia.

E' stato quindi condotto un secondo esperimento di terapia con un maggior numero di topi (n=24) al fine di avere tre gruppi che potessero ricevere trattamenti diversi: L19-IL2 e OC-46F2 come terapia singola o in combinazione. Inoltre poiché OC-46F2 non presentava tossicità la dose è stata aumentata a 80 µg (high dose, HD), lasciando la dose di L19-IL2 invariata a causa della tossicità di IL2. Come mostra la figura 7C, i gruppi dei topi erano: non trattato o trattato con OC-46F2 e L19-IL2 come terapia singola o in combinazione. La terapia combinata (HD) inibiva completamente la crescita del tumore fino al giorno 90 in diciassette su ventiquattro topi trattati (71%). Dal giorno 32 la “two-tailed p value” del gruppo L19-IL2/OC-46F2 high dose in confronto ai gruppi trattati con OC-46F2 e L19-IL2 erano rispettivamente estremamente significativa (p<0.0001) e molto significativa (p=0.0037) dimostrando l' efficacia della terapia combinata (Fig. 7C). Al giorno 124 la “tumor free survival” degli animali nel gruppo L19-IL2/OC-46F2 high dose era il 64% rispetto allo 0% nel gruppo trattato con L19-IL2 (Fig. 7D). Per analizzare i tumori in seguito ai trattamenti, l' esperimento è stato interrotto al giorno 140 quando i volumi dei tumori erano compresi tra 0.8 e 1.6

cm³. In nessuno degli animali dei vari gruppi è stata osservata perdita di peso maggiore del 3%. I sette topi che non avevano risposto alla terapia combinata dei 24 trattati (29%) sono stati randomizzati in tre gruppi e sottoposti a una secondo ciclo di terapia seguendo il protocollo terapeutico in fig. 7A. Un ritardo nella crescita del tumore era stata osservata nel gruppo dove le due molecole erano somministrate insieme (Fig. S5).

Nella Figura 8A-C si osserva una notevole riduzione del numero dei vasi nei tumori dei topi trattati con OC-46F2 sia come terapia singola che combinata, come mostrato utilizzando gli anticorpi anti-Desmina e anti-SMA rispettivamente markers di vasi precoci e di vasi maturi. Inoltre l'espressione dei due markers di VM, VEGFR2 e CD144, era per lo più negativa nei tumori degli animali che avevano ricevuto OC-46F2 (Fig. 8 D). Questi esperimenti eseguiti per valutare la densità vascolare e la "vascular mimicry" in tumori di topi trattati, confermano l'efficacia di OC-46F2 nell'inibizione della VM, come già riportato precedentemente negli esperimenti *in vitro*.

MATERIALI E METODI

Linee cellulari e tessuti umani

Culture primarie di cellule di melanoma MeTA, MeMO, MeMI, MePA, MeOV, MeCoP, MeFeR, MeBO, MeTU, MeDeBo [45], la linea cellulare di melanoma umano metastatico MV3 da S. Ferrone (New York Medical College), la linea di melanoma umano SKMEL28 (ATCC, Rockville, MD) erano coltivate in RPMI 1640 con aggiunta di 10% FBS e 2% L-glutamine. La linea cellulare endoteliale telomerase-immortalized human microvascular endothelium, TIME (ATCC), era coltivata in Endothelial Cell Basal Medium-2 (EBM-2) fornito nel kit Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2 bullet kit (EGM-2-MV) da Lonza/Clonetics Corporation (Basel, Switzerland). Tutte le linee cellulari erano cresciute a 37°C in incubatore a 5% CO₂. Tutte le linee erano utilizzate a sei mesi dallo scongelamento.

MeTA met è stata isolata da metastasi polmonari di topo e coltivata in RPMI 1640 supplemented con aggiunta di 10% FBS e 2% L-glutamine fino ad avere il 100% di cellule positive con l' anticorpo anti Ki67 specifico per la proteina umana. Tutti i tessuti di melanoma metastatico umano usati in immunofluorescenza sono stati ottenuti seguendo le procedure di consenso informato approvate dal comitato etico interno all' istituto IRCCS S. Martino-IST, Italy.

Analisi citofluorimetrica

Per l' analisi citofluorimetrica indiretta a un colore, le cellule sono state colorate con scFv OC-46F2 (5 µg/ml) insieme all' anticorpo murino IgG1 anti-Myc 9E10 (2.5 µg/ml) (ATCC, Rockville, MD) o con l' anticorpo murino IgG1 anti-human CD31 (M0823, DAKO, Glostrup, Denmark). Come anticorpi secondari sono stati usati gli specifici controlli isotipici PE coniugati (Life Technologies). Le linee cellulari di melanoma SKMEL28 e MV3 sono state incubate tutta la notte in presenza o assenza di 5-10 µg/ml di p-Nitrophenyl- α -D-xylopyranoside (PNPX) (Sigma) [46]. Il giorno dopo l' espressione del sindecano-1 era rilevata in citofluorimetria tramite l' uso di OC-46F2 o B-A38 (10-520-C100, Exbio, Czech Republic). Gli anticorpi anti-CD133/1 (AC133), anti-c-Kit/CD117 – PE (AC126-PE), anti-p75 neurotrophin recettore (NTR)/CD271-PE e i loro controlli isotipici erano forniti da Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Germany) e da Southern Biotechnology Associated (Birmingham, AL, USA).

RT-PCR e qRT-PCR

RNAeasy mini kit (Qiagen) è stato utilizzato per estrarre l' RNA totale da cellule di melanoma umano e il RealMasterScript SuperMix Kit (5 Prime) è stato utilizzato per generare il cDNA. Le

amplificazioni sono state fatte per 30 cicli (30 s a 95°C, 30 s a 58°C, 30 sec a 72°C) per tutti I geni eccetto il sindecano-1 e Nodal (35 cycles), e CD144 (40 cycles) utilizzando Platinum TAQ (Life Technology). I prodotti di PCR sono stati caricati su gel di agaroso all' 1.5% e visualizzati con etidio bromuro. Il SybrGreen-based kit (Invitrogen) è stato utilizzato per Real Time PCR. I primers specifici per i singoli geni sono riportati nella tabella supplementare S2.

Purificazione e caratterizzazione dell' anticorpo umano ricombinante scFv OC-46F2 e dell' immunocitochina L19-IL2

L' anticorpo scFv OC-46F2, l' immunocitochina L19-IL2 e i loro controlli sono stati purificati dai medi condizionati di cellule di mammifero esprimenti le varie proteine per immunoaffinità e caratterizzati come descritto in precedenza [22, 34]. scFv OC-46F2 e il suo controllo sono stati purificati su ProteinA/Sepharose (GE Healthcare). L' immunocitochina L19-IL2 è stata purificata sull' ED-B della fibronettina [47] coniugata al Sepharose 4B (GE Healthcare). Le proteine sono state dializzate in phosphate buffer saline (PBS) tutta la notte a +4°C e filtrate sterilmente con filtri Millex-GP 0.22 µm (Millipore). In seguito sono state analizzate in condizioni riducenti su gel di acrilammide (SDS-PAGE) e in condizioni native tramite cromatografia liquida su una colonna Superdex 200 (Fig. S6 supplementare).

Test *in vitro* su Matrigel

Un sottile strato di reduced growth factor Matrigel alla concentrazione di 18 mg/ml (354263, Corning, Bedford, US) è stato distribuito su vetrini coprioggetto in piastre per colture cellulari da 24 pozzetti e lasciato per 30 minuti 37°C. Sono state trasferite 4×10^4 cellule di melanoma per pozzetto o 9×10^4 cellule endoteliali per pozzetto nel medio specifico di coltura e incubate a 37°C in 5% CO₂ ed è tubulari o tubuli vascolari. Per verificare la capacità dell' scFv OC-46F2 di inibire la formazione dei tubuli da parte di cellule di melanoma, la linea SKMEL28 transfettata con il plasmide vuoto pcDNA3.1 o scFv OC-46F2 o un scFv di controllo [22] è stata piastrata su Matrigel nello specifico medio completo e incubata a 37°C 5% CO₂ per 48 ore. Inoltre, OC-46F2 o scFv di controllo e l' immunocitochina L19-IL2 sono stati aggiunti alla concentrazione di 200 µg/ml dopo 4-6 ore che le cellule SKMEL28, MeTA and TIME iniziavano a formare i tubuli [19]. Tutti gli esperimenti sono stati fatti in triplicato. Dopo fissazione in 2% paraformaldehyde in PBS, I tubuli neoformati sono stati contati in 10 campi differenti per vetrino in luce chiara al microscopio (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) agli ingrandimenti 100X o 50X rispettivamente per le cellule di melanoma e le cellule endoteliali. Le immagini al microscopio sono state catturate utilizzando la fotocamera DM LB2 (Leica).

Co-culture di cellule endoteliali e cellule di melanoma su Matrigel

Un sottile strato di “reduced growth factor Matrigel” alla concentrazione di 18 mg/ml (354263, Corning, Bedford, US) è stato messo su vetrini coprioggetto in piastre per colture cellulari da 24 pozzetti e lasciato per 30 minuti a 37°C. Sono state trasferite 1×10^5 cellule endoteliali TIME per pozzetto nel medio specifico di coltura e incubate tutta la notte a 37°C in 5% CO₂. Il giorno dopo avvenuta la formazione dei tubi vascolari le cellule MeTA-GFP (4×10^4 cellule/pozzetto) sono aggiunte e la formazione dei vasi è stata analizzata in tempo reale al microscopio invertito. Dopo 4 ore si procede con la fissazione in 2% paraformaldeide in PBS e l'analisi in immunofluorescenza.

Test *in vivo* per angiogenesi (*In vivo* Matrigel plug assay)

Topi C57BL/6J maschi (Charles River Laboratories International, Wilmington, MA, USA) sono stati iniettati sottocute con 500 µl di “reduced growth factor Matrigel phenol red free” (356231, Corning) alla concentrazione di 10 mg/ml con 300 ng/ml FGF2 e 30 UI/ml eparina in assenza o presenza di 100, 200, 400 o 600 µg/topo di scFv OC-46F2 o scFv di controllo. Dopo 4 giorni gli animali sono stati sacrificati e i “plugs” di Matrigel rimossi [48, 49].

Immunofluorescenza e immunoistochimica

Per la colorazione in immunofluorescenza, i tumori o i polmoni prelevati dagli animali sono stati inclusi in “cryo embedding medium” (Kaltex, Italy) e conservati a -80°C. Le sezioni dei tumori (6 µm) sono state fissate in acetone freddo per 10 minuti e asciugate all'aria. Le cellule sono piastrate sui vetrini in piastre da 24 pozzetti in medio completo e sono cresciute a 37°C in 5% CO₂. Le cellule sono fissate in 2% paraformaldeide in PBS per 30 minuti e permeabilizzate in 0,1% Triton in PBS per 10 minuti.

Sono stati usati i seguenti anticorpi: scFv OC-46F2 (5 µg/ml) miscelato con anti-Myc (1.25 µg/ml), ratto anti CD31 murino (clone MEC 13.3, gentilmente fornito da A. Mantovani, Humanitas Institute, Milan, Italy), topo IgG1 anti CD31 umano, anticorpo policlonale di coniglio anti-VEGFR-2 (ab2349, Abcam, UK), IgG2b murino anti CD144 umano (MAB9381, R&D Systems, Minneapolis, USA), L19IgG1 umano anti B-fibronectin [15], capra anti NUMA umano (sc-18557, Santa Cruz, Texas, USA), anticorpo policlonale di pollo anti-GFP (ab13970, Abcam), murino anti ki-67 umano (M0722, Sigma-Aldrich), murino anti smooth muscle actin umana (SMA) (DAKO) e anticorpo policlonale di coniglio anti-desmina (Abcam). Come anticorpi secondari: Alexa Fluor 350, 488 o 594 goat anti-mouse IgG₁ per anti-Myc e anti-human CD31, Alexa Fluor 594 goat anti-rat per anti-mouse CD31, Alexa Fluor 594 goat anti rabbit per anti-VEGF receptor-2, Alexa Fluor

594 goat anti-mouse IgG_{2b} per anti human-CD144, Alexa Fluor 594 chicken anti goat o Alexa Fluor 350 donkey anti goat per anti-Numa, Alexa Fluor 488 goat anti chicken per anti-GFP e Alexa Fluor 488 o 594 goat per L19IgG1, Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG_{2a} per anti-SMA e Alexa Fluor 594 goat anti rabbit per anti-desmin (Life Technologies, USA). Le sezioni di tessuto o le cellule sono state controcolorate con DAPI ProLong® Gold Antifade Mountant (Life Technologies) o Glycer gel (DAKO). Le immagini sono state catturate con il microscopio ApoTome fornito di fotocamera AxioCam (Karl Zeiss, Thornwood, NY, USA). Le procedure di immunoistochimica sono state descritte in Orecchia et al. [22].

Modelli sperimentali murini

Topi immunodepressi NOD SCID di sesso femminile di sei settimane sono stati acquistati dalla ditta Charles River Laboratories International (Wilmington, MA, USA) e allevati nello stabulario dell' istituto IRCCS AOU San Martino-IST, Genova. Allevamento, trattamenti e sacrificio degli animali seguono la legislazione nazionale (Italian law no. 116, 1992 and no. 26, 2014) per la protezione degli animali utilizzati per la ricerca scientifica. Topi immunodepressi NOD SCID di sesso femminile di sei settimane sono stati iniettati sottocute (s.c.) con 5×10^6 cellule di melanoma SKMEL28, MeTA, MeMO, MeMI, MePA, MeOV, MeCoP e MeFeR e la crescita dei tumori è stata monitorata giornalmente.

10^7 cellule di melanoma umano SKMEL28 e MeTA sono state iniettate sottocute in topi NOD SCID. Gli animali sono stati sacrificati quando il volume del tumore aveva raggiunto circa 1.0 cm^3 . Cellule di melanoma umano MV3, SKMEL28, MeTA, MeMI, MePA (1.5×10^6 cellule/topo) sono state iniettate in vena (i.v.) in topi immunodepressi NOD SCID di sesso femminile di sei settimane. Diciotto giorno dopo l' iniezione delle cellule MV3 a 45 giorni dopo l' iniezione delle altre linee cellulari, i topi sono stati sacrificati e i polmoni prelevati.

Tutti i trattamenti *in vivo* con le proteine purificate OC-46F2[22] o L19-IL2 [34], somministrate sia come monoterapia sia in terapia combinata, sono stati fatti utilizzando topi NOD-SCID ciascuno iniettato sottocute con 10^7 SKMEL28 cellule di melanoma umano. Quando i tumori erano palpabili, i topi sono stati suddivisi casualmente nei differenti gruppi di trattamento.

Nel caso di terapie singole, sono stati fatti due gruppi di otto topi ciascuno e ogni animale riceveva 80 µg di scFv OC-46F2 ogni giorno dal giorno 8 al giorno 25 e 40 µg di L19-IL2 ogni tre giorni dal giorno 9 al giorno 21 dal giorno dell' iniezione delle cellule sottocute tramite iniezione nella vena caudale. Gruppi di topi che non hanno ricevuto trattamenti sono stati utilizzati come controllo. Per il primo ciclo di terapia combinata con bassa dose (low dose, LD) o alta dose (high dose, HD) di OC-46F2, due gruppi di 13 o 24 topi sono stati iniettati rispettivamente con 40 µg o 80 µg di OC-46F2

insieme a 40 µg di L19-IL2 seguendo lo stesso protocollo della monoterapia. Per il secondo ciclo di terapia i 6 topi del gruppo LD e i tre del gruppo HD sono stati iniettati rispettivamente con 40 µg o 80 µg di OC-46F2 ogni giorno dal giorno 49 al giorno 56 dal giorno dell' iniezione delle cellule sottocute insieme a 40 µg di L19-IL2 ai giorni 40, 43 e 46 nella vena caudale. Per il secondo ciclo di trattamento in monoterapia del gruppo HD è stato seguito lo stesso protocollo utilizzato per la terapia combinata somministrando OC-46F2 e L19-IL2 separatamente. Nei giorni in cui le due proteine erano somministrate insieme, OC-46F2 era iniettato nel peritoneo dopo 6 ore dall' iniezione in vena di L19-IL2.

Tutti i giorni dall' impianto delle cellule sottocute, i volumi dei tumori erano calcolati in base alla seguente formula: $(d)^2 \times D \times 0.52$, in cui d e D sono rispettivamente il diametro corto e quello lungo del tumore misurati con il calibro. Il peso degli animali è stato registrato giornalmente. Gli animali sono stati sacrificati quando il volume del tumore raggiungeva un volume tra 0.8 e 1.6 cm³ e in seguito i tumori erano conservati a -80°C.

Analisi statistica

Tutti i risultati presentati sono la media $\text{mean} \pm \text{SE}$. Le analisi statistiche sono state fatte utilizzando il test non parametrico Mann Whitney usando Prism 6 per MAC.

DISCUSSIONE

E' stato osservato che nei tumori molto aggressivi incluso il melanoma caratterizzati dalla presenza di VM la sopravvivenza dei pazienti si aggira intorno ai cinque anni. Inoltre, il fatto che nei pazienti affetti da melanoma metastatico sia presente una maggiore percentuale di VM rispetto ai pazienti con melanoma primario, indica che il processo di VM è in grado di promuovere la metastatizzazione [20, 36]. Recentemente molti studi sono stati condotti per la ricerca di nuovi trattamenti antitumorali combinati alle terapie anti-angiogeniche per inibire la VM. Il Thalidomide, uno dei pochi farmaci anti-angiogenici in grado di inibire la formazione di tubuli simil-vascolari in un modello sperimentale di melanoma, non può essere utilizzato in terapia clinica a causa dell'effetto teratogeno [37]. Inoltre molti farmaci anti-angiogenici come l' anticorpo monoclonale bevacizumab, l' endostatina e il TNP-470 non hanno effetto sulla VM e altri come il sunitinib inducono la VM da parte delle cellule tumorali in un modello di tumore alla mammella [23, 38-40]. Per la cura del melanoma in stadio avanzato l' immunocitochina L19-IL2, un nuovo farmaco antiangiogenico, è stato utilizzato in studi clinici di fase II[10, 14-18].

Recentemente abbiamo osservato che il blocco dell' attività del sindecano-1 con l' anticorpo ricombinante umano scFv OC-46F2 induce l' inibizione della maturazione vascolare e della crescita tumorale in un modello sperimentale di melanoma umano e di carcinoma ovarico [22]. Noi abbiamo osservato che la VM da parte delle cellule di melanoma è inibita dal SU1498, un inibitore specifico del VEGFR-2, come già dimostrato nelle linee cellulari di glioblastoma [23]. I risultati concordano con i nostri precedenti dati e con molti lavori che hanno descritto la presenza di un' interazione tra il sindecano-1 e il VEGFR-2 [22, 23, 41, 42]. Tuttavia altri recettori potrebbero essere coinvolti nella VM, come recentemente descritto per il VEGFR-1 [24]. Noi abbiamo dimostrato che cellule di melanoma umano, esprimenti il sindecano-1, con fenotipo vascolare e con caratteristiche di staminalità, esprimono due molecole coinvolte nella VM del melanoma, il CD144 e il VEGFR-2 [20, 43]. Inoltre, tutte queste linee cellulari non esprimono il CD31 a differenza di quanto descritto da Dunleavey et al., che ha osservato una sottopopolazione di cellule di melanoma positive per il CD31 e negative per il VEGFR-2 [44]. Abbiamo inoltre osservato un aumento dell' espressione del sindecano-1 a livello di mRNA in cellule di melanoma isolate da metastasi murine (MeTA met) ai polmoni rispetto alle cellule iniettate (MeTA). Dall' analisi dei noduli metastatici si osserva che il sindecano-1 è espresso agli stadi precoci dello sviluppo metastatico, così come avviene per il VEGFR-2 e il CD144. Inoltre, gli esperimenti *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che l' anticorpo OC-46F2 era in grado di inibire la VM delle cellule di melanoma e l' attività pro-angiogenica del sindecano-1.

Mettendo a confronto l' espressione del sindecano-1 e dell' isoforma EDB della fibronettina nei tessuti di melanoma tramite l' uso degli anticorpi OC-46F2 e L19, abbiamo osservato che molti vasi erano positivi solo con l' anticorpo anti-sindecano. Queste osservazioni preliminari ci hanno quindi condotto ad indagare sull' efficacia della terapia combinata con OC-46F2 e L19-IL2 in esperimenti di terapia pre-clinica. Inoltre l' utilizzo di una linea cellulare di melanoma umano in topi immunocompromessi NOD-SCID ci ha permesso di studiare se i vasi tumorali fossero di origine murina o umana e di verificare l' efficacia dei due trattamenti specifici per i differenti target dello stroma tumorale.

E' stato osservato che la terapia combinata utilizzando l' anticorpo bloccante OC-46F2 anti sindecano-1 e l' immunocitochina L19-IL2 portava nel 71% dei topi trattati a una completa inibizione della crescita del melanoma fino al giorno 90 dall' impianto sottocute. Un secondo ciclo di terapia combinata negli animali che non avevano risposto alla terapia si è verificato efficace nel ritardare la crescita del tumore. Inoltre, monitorando gli animali per un lungo periodo di tempo, si è osservato che al giorno 124 la sopravvivenza degli animali era il 64% nel gruppo L19-IL2/OC-46F2 high dose mentre nel gruppo trattato con L19-IL2 era lo 0%. L' analisi dei tessuti tumorali espuntati dai topi trattati con OC-46F2 come monoterapia o in terapia combinata conferma che l' anticorpo anti sindecano-1 inibisce la maturazione vascolare e induce la perdita di strutture tubulari simil-vascolari. Questi risultati suggeriscono che la terapia combinata potrebbe migliorare l' efficacia terapeutica di L19-IL2 e OC-46F2 somministrati come monoterapia e che OC-46F2 può essere somministrato al alte dosi senza nessun effetto tossico. Sulla base di questi risultati sarebbe interessante estendere gli esperimenti preclinici di terapia combinata a un modello sperimentale di melanoma umano con cellule derivate da paziente. In conclusione, i dati indicano per la prima volta che il sindecano-1 è coinvolto nel fenomeno di "vascular mimicry" nel melanoma metastatico. Bloccare l' attività del sindecano-1 con l' anticorpo OC-46F2 in combinazione con L19-IL2 potrebbe essere un nuovo approccio terapeutico per la cura del melanoma metastatico. Inoltre i nostri dati confermano che le terapie più efficaci sono quelle in grado di bersagliare differenti molecole coinvolte nei meccanismi responsabili della progressione tumorale.

REFERENZE

1. Carmeliet P and Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011; 473:298-307.
2. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*. 2007; 6:273-286.
3. Weis SM and Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*. 2011; 17:1359-1370.
4. Chung AS, Lee J and Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10:505-514.
5. Corrie PG, Basu B and Zaki KA. Targeting angiogenesis in melanoma: prospects for the future. *Ther Adv Med Oncol*. 2010; 2:367-380.
6. Emmett MS, Dewing D and Pritchard-Jones RO. Angiogenesis and melanoma - from basic science to clinical trials. *Am J Cancer Res*. 2011; 1:852-868.
7. Abdollahi A and Folkman J. Evading tumor evasion: current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy. *Drug Resist Updat*. 2010; 13:16-28.
8. Moserle L, Jimenez-Valerio G and Casanovas O. Antiangiogenic therapies: going beyond their limits. *Cancer Discov*. 2014; 4:31-41.
9. Helfrich I and Schadendorf D. Blood vessel maturation, vascular phenotype and angiogenic potential in malignant melanoma: one step forward for overcoming anti-angiogenic drug resistance? *Mol Oncol*. 2011; 5:137-149.
10. Pretto F and Neri D. Pharmacotherapy of metastatic melanoma: emerging trends and opportunities for a cure. *Pharmacol Ther*. 2013; 139:405-411.
11. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, Lebbe C, Baurain JF, Testori A, Grob JJ, Davidson N, Richards J, Maio M, Hauschild A, Miller WH, Jr., Gascon P, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2011; 364:2517-2526.
12. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011; 364:2507-2516.
13. Ferrucci PF, Minchella I, Mosconi M, Gandini S, Verrecchia F, Cocorocchio E, Passoni C, Pari C, Testori A, Coco P and Munzone E. Dacarbazine in combination with bevacizumab for the treatment of unresectable/metastatic melanoma: a phase II study. *Melanoma research*. 2015; 25:239-245.
14. Danielli R, Patuzzo R, Ruffini PA, Maurichi A, Giovannoni L, Elia G, Neri D and Santinami M. Armed antibodies for cancer treatment: a promising tool in a changing era. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2015; 64:113-121.
15. Borsi L, Balza E, Bestagno M, Castellani P, Carnemolla B, Biro A, Leprini A, Sepulveda J, Burrone O, Neri D and Zardi L. Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin. *International journal of cancer*. 2002; 102:75-85.
16. Eigentler TK, Weide B, de Braud F, Spitaleri G, Romanini A, Pflugfelder A, Gonzalez-Iglesias R, Tasciotti A, Giovannoni L, Schwager K, Lovato V, Kaspar M, Trachsel E, Menssen HD, Neri D and Garbe C. A dose-escalation and signal-generating study of the immunocytokine L19-IL2 in combination with dacarbazine for the therapy of patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011; 17:7732-7742.
17. Weide B, Eigentler TK, Pflugfelder A, Zelba H, Martens A, Pawelec G, Giovannoni L, Ruffini PA, Elia G, Neri D, Gutzmer R, Becker JC and Garbe C. Intralesional treatment of stage III metastatic melanoma patients with L19-IL2 results in sustained clinical and systemic immunologic responses. *Cancer Immunol Res*. 2014; 2:668-678.

18. Danielli R, Patuzzo R, Di Giacomo AM, Gallino G, Maurichi A, Di Florio A, Cutaia O, Lazzeri A, Fazio C, Miracco C, Giovannoni L, Elia G, Neri D, Maio M and Santinami M. Intralesional administration of L19-IL2/L19-TNF in stage III or stage IVM1a melanoma patients: results of a phase II study. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2015; 64:999-1009.
19. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS and Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*. 1999; 155:739-752.
20. Qiao L, Liang N, Zhang J, Xie J, Liu F, Xu D, Yu X and Tian Y. Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *J Cell Mol Med*. 2015; 19:315-326.
21. Yao X, Ping Y, Liu Y, Chen K, Yoshimura T, Liu M, Gong W, Chen C, Niu Q, Guo D, Zhang X, Wang JM and Bian X. Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) plays a key role in vasculogenic mimicry formation, neovascularization and tumor initiation by Glioma stem-like cells. *Plos One*. 2013; 8:e57188.
22. Orecchia P, Conte R, Balza E, Petretto A, Mauri P, Mingari MC and Carnemolla B. A novel human anti-syndecan-1 antibody inhibits vascular maturation and tumour growth in melanoma. *Eur J Cancer*. 2013; 49:2022-2033.
23. Francescone R, Scully S, Bentley B, Yan W, Taylor SL, Oh D, Moral L and Shao R. Glioblastoma-derived tumor cells induce vasculogenic mimicry through Flk-1 protein activation. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287:24821-24831.
24. Frank NY, Schatton T, Kim S, Zhan Q, Wilson BJ, Ma J, Saab KR, Osherov V, Widlund HR, Gasser M, Waaga-Gasser AM, Kupper TS, Murphy GF and Frank MH. VEGFR-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth. *Cancer research*. 2011; 71:1474-1485.
25. Hendrix MJ, Seftor EA, Meltzer PS, Gardner LM, Hess AR, Kirschmann DA, Schatteman GC and Seftor RE. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:8018-8023.
26. Xian X, Gopal S and Couchman JR. Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res*. 2010; 339:31-46.
27. Sanderson RD, Lalor P and Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul*. 1989; 1:27-35.
28. O'Connell MP, Fiori JL, Kershner EK, Frank BP, Indig FE, Taub DD, Hoek KS and Weeraratna AT. Heparan sulfate proteoglycan modulation of Wnt5A signal transduction in metastatic melanoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 2009; 284:28704-28712.
29. Teng YH, Aquino RS and Park PW. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol*. 2012; 31:3-16.
30. Gharbaran R. Advances in the molecular functions of syndecan-1 (SDC1/CD138) in the pathogenesis of malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015; 94:1-17.
31. Purushothaman A, Uyama T, Kobayashi F, Yamada S, Sugahara K, Rapraeger AC and Sanderson RD. Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood*. 2010; 115:2449-2457.
32. Wang X, Katayama A, Wang Y, Yu L, Favoino E, Sakakura K, Favole A, Tsuchikawa T, Silver S, Watkins SC, Kageshita T and Ferrone S. Functional characterization of an scFv-Fc antibody that immunotherapeutically targets the common cancer cell surface proteoglycan CSPG4. *Cancer research*. 2011; 71:7410-7422.
33. Huang S, Luca M, Gutman M, McConkey DJ, Langley KE, Lyman SD and Bar-Eli M. Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. *Oncogene*. 1996; 13:2339-2347.
34. Carnemolla B, Borsi L, Balza E, Castellani P, Meazza R, Berndt A, Ferrini S, Kosmehl H, Neri D and Zardi L. Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood*. 2002; 99:1659-1665.

35. Kaspar M, Zardi L and Neri D. Fibronectin as target for tumor therapy. *International journal of cancer*. 2006; 118:1331-1339.
36. Cao Z, Bao M, Miele L, Sarkar FH, Wang Z and Zhou Q. Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: a systemic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2013; 49:3914-3923.
37. Zhang S, Li M, Gu Y, Liu Z, Xu S, Cui Y and Sun B. Thalidomide influences growth and vasculogenic mimicry channel formation in melanoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2008; 27:60.
38. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C and Tabar V. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*. 2010; 468:829-833.
39. Seftor RE, Hess AR, Seftor EA, Kirschmann DA, Hardy KM, Margaryan NV and Hendrix MJ. Tumor cell vasculogenic mimicry: from controversy to therapeutic promise. *Am J Pathol*. 2012; 181:1115-1125.
40. Zhang D, Sun B, Zhao X, Ma Y, Ji R, Gu Q, Dong X, Li J, Liu F, Jia X, Leng X, Zhang C, Sun R and Chi J. Twist1 expression induced by sunitinib accelerates tumor cell vasculogenic mimicry by increasing the population of CD133+ cells in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer*. 2014; 13:207.
41. Rapraeger AC, Ell BJ, Roy M, Li X, Morrison OR, Thomas GM and Beauvais DM. Vascular endothelial-cadherin stimulates syndecan-1-coupled insulin-like growth factor-1 receptor and cross-talk between α V β 3 integrin and vascular endothelial growth factor receptor 2 at the onset of endothelial cell dissemination during angiogenesis. *The FEBS journal*. 2013; 280:2194-2206.
42. Lamorte S, Ferrero S, Aschero S, Monitillo L, Bussolati B, Omede P, Ladetto M and Camussi G. Syndecan-1 promotes the angiogenic phenotype of multiple myeloma endothelial cells. *Leukemia*. 2012; 26:1081-1090.
43. Civenni G, Walter A, Kobert N, Mihic-Probst D, Zipser M, Belloni B, Seifert B, Moch H, Dummer R, van den Broek M and Sommer L. Human CD271-Positive Melanoma Stem Cells Associated with Metastasis Establish Tumor Heterogeneity and Long-term Growth. *Cancer research*. 2011; 71:3098-3109.
44. Dunleavy JM, Xiao L, Thompson J, Kim MM, Shields JM, Shelton SE, Irvin DM, Brings VE, Ollila DW, Brekken RA, Dayton PA, Melero-Martin JM and Dudley AC. Vascular channels formed by subpopulations of PECAM1+ melanoma cells. *Nat Commun*. 2014; 5:5200.
45. Pietra G, Manzini C, Vitale M, Balsamo M, Ognio E, Boitano M, Queirolo P, Moretta L and Mingari MC. Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells. *Int Immunol*. 2009; 21:793-801.
46. Delcommenne M and Klingemann HG. Detection and characterization of syndecan-1-associated heparan sulfate 6-O-sulfated motifs overexpressed in multiple myeloma cells using single chain antibody variable fragments. *Hum Antibodies*. 2012; 21:29-40.
47. Carnemolla B, Neri D, Castellani P, Leprini A, Neri G, Pini A, Winter G and Zardi L. Phage antibodies with pan-species recognition of the oncofoetal angiogenesis marker fibronectin ED-B domain. *International journal of cancer*. 1996; 68:397-405.
48. Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS and Martin GR. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest*. 1992; 67:519-528.
49. Prewett M, Huber J, Li Y, Santiago A, O'Connor W, King K, Overholser J, Hooper A, Pytowski B, Witte L, Bohlen P and Hicklin DJ. Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer research*. 1999; 59:5209-5218.

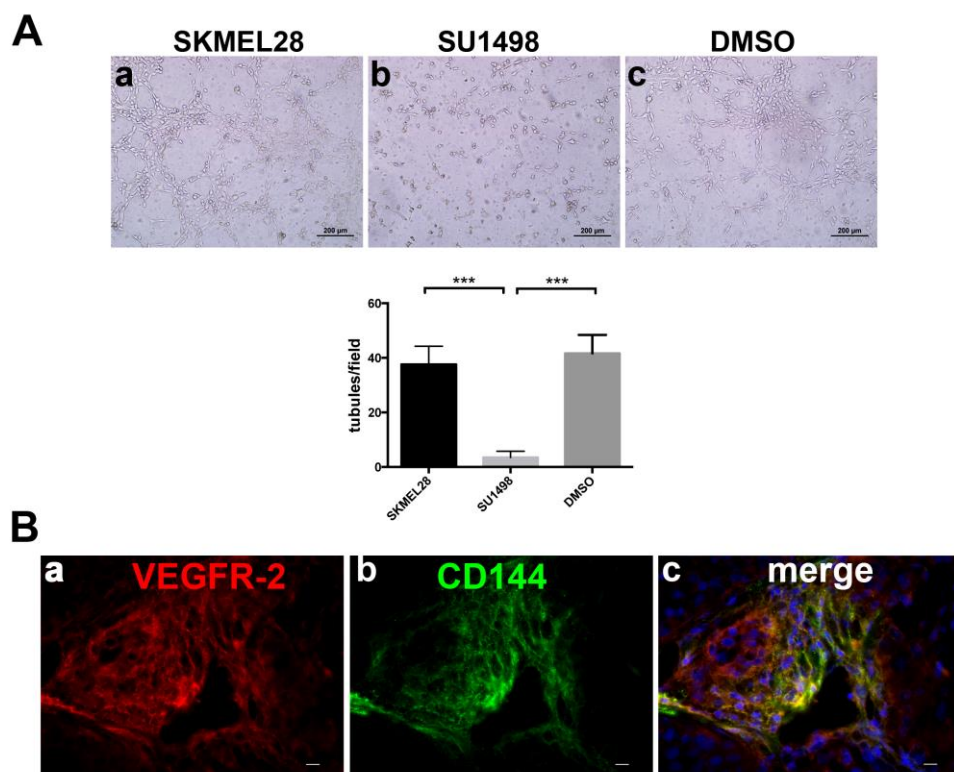


FIGURE 1

Figura 1. Il recettore VEGFR-2 è coinvolto nella VM del melanoma. A, formazione di tubuli *in vitro* su Matrigel utilizzando le cellule di melanoma SKMEL28 in presenza di SU1498 (b) in comparazione a cellule non trattate (a) o trattate con DMSO (c). Le differenze quantitative nella formazione dei tubuli sono rappresentate dai grafici a colonna riportati sotto gli esperimenti *** indicano differenze estremamente significative tra cellule trattate con SU1498 o trattate con DMSO o non trattate. Scale bars, 200µm. Le medie \pm SE sono riportate. B, immunofluorescenze di sezioni al criostato di SKMEL28/NOD SCID, colorate con gli anticorpi anti VEGFR-2 (a) e anti CD144 (b). Il merge mostra la co-localizzazione di VEGFR-2 con CD144 (c). Scale bars, 10µm.

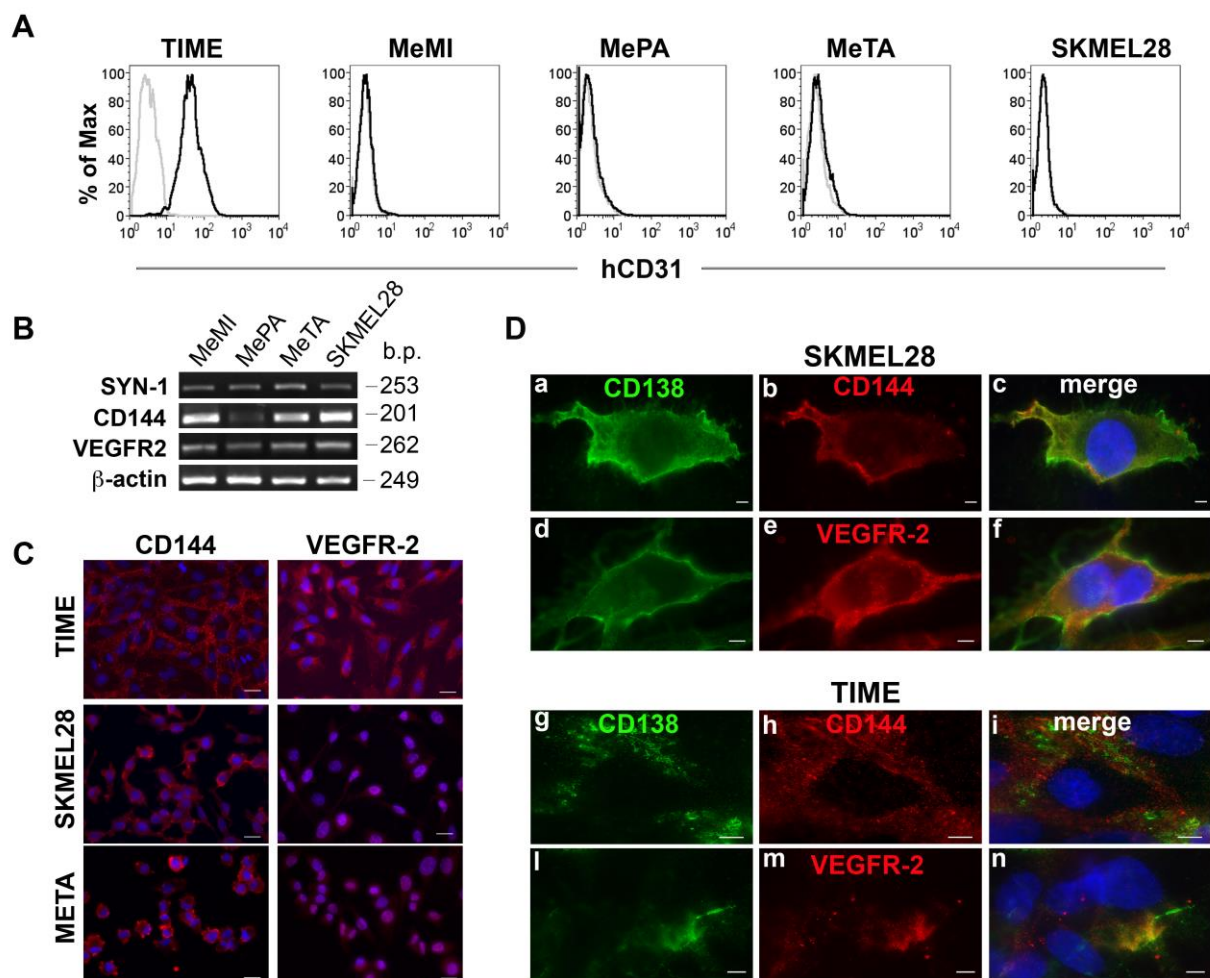


FIGURE 2

Figura 2. Espressione di CD31 umano, CD144 e VEGFR-2 in cellule di melanoma sindecano-1 positive. A, Analisi citofluorimetrica dell'espressione di CD31 umano in cellule endoteliali TIME e cellule di melanoma MeMI, MePA, MeTA e SKMEL28. I profili grigi rappresentano il controllo negativo. B, RT-PCR del sindecano-1, CD144 e VEGFR-2 umani nelle cellule di melanoma MeMI, MePA, MeTA e SKMEL28. La Beta-actina è stata usata come controllo positivo. Le paia di basi (b.p.) dei geni umani sono indicate. C, Immunofluorescenza delle cellule endoteliali TIME e delle cellule di melanoma SKMEL28 e MeTA colorate con gli anticorpi anti-CD144 o anti VEGFR-2 e controcolorate con DAPI. Scale bars, 20 μ m. D, Immunofluorescenza delle cellule di melanoma SKMEL28 e delle cellule endoteliali TIME in cui è mostrata la co-distribuzione del sindecano-1 (CD138) con il CD144 o il VEGFR-2. Scale bars, 10 μ m.

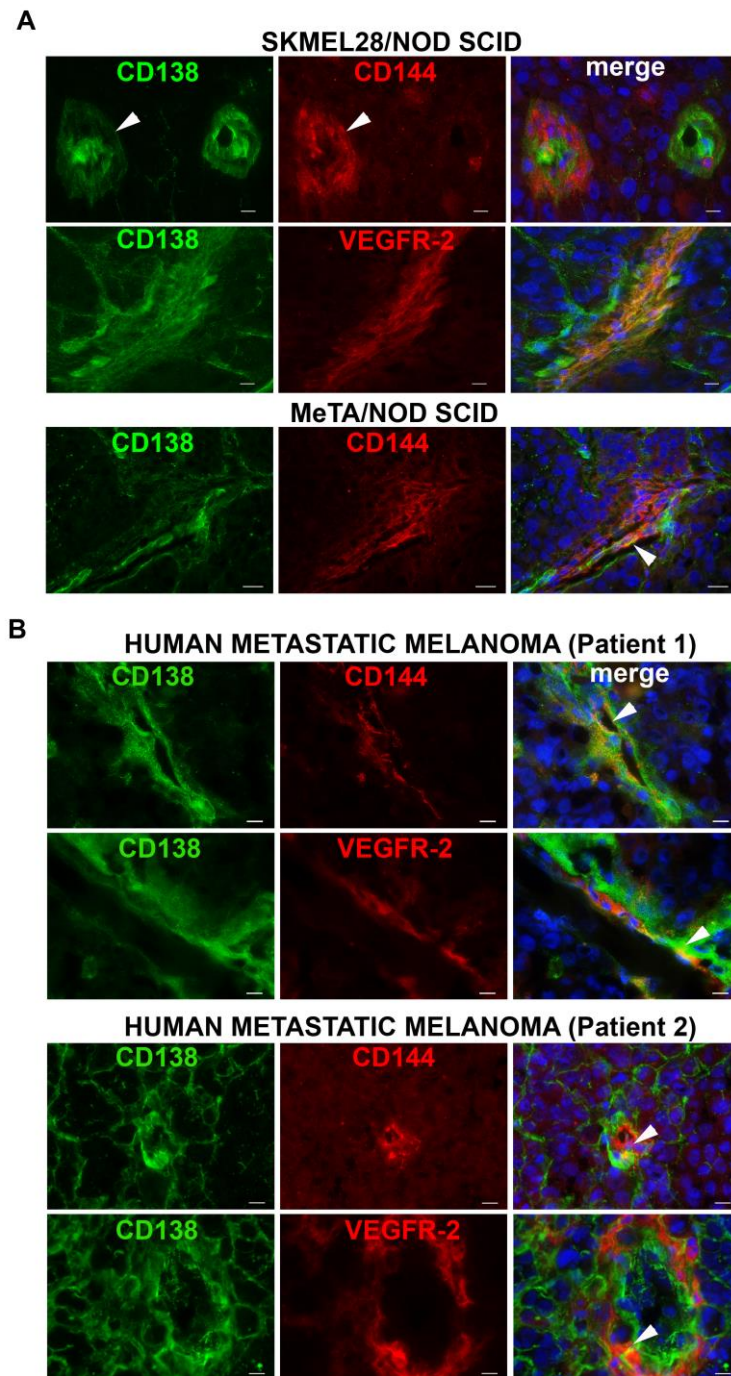


FIGURE 3

Figura 3. Il sindecano-1 co-localizza con il CD144 e il VEGFR-2 nei tessuti di melanoma.

Immunofluorescenza di sezioni al criostato dei melanomi SKMEL28 e MeTA indotti in topi NOD-SCID (A) e di melanoma metastatico da due differenti pazienti (B) colorate in doppio con OC-46F2 e gli anticorpi anti-VEGFR-2 o anti-CD144, come indicato in figura, e controcolorate con DAPI. Scale bars, 10 μ m.

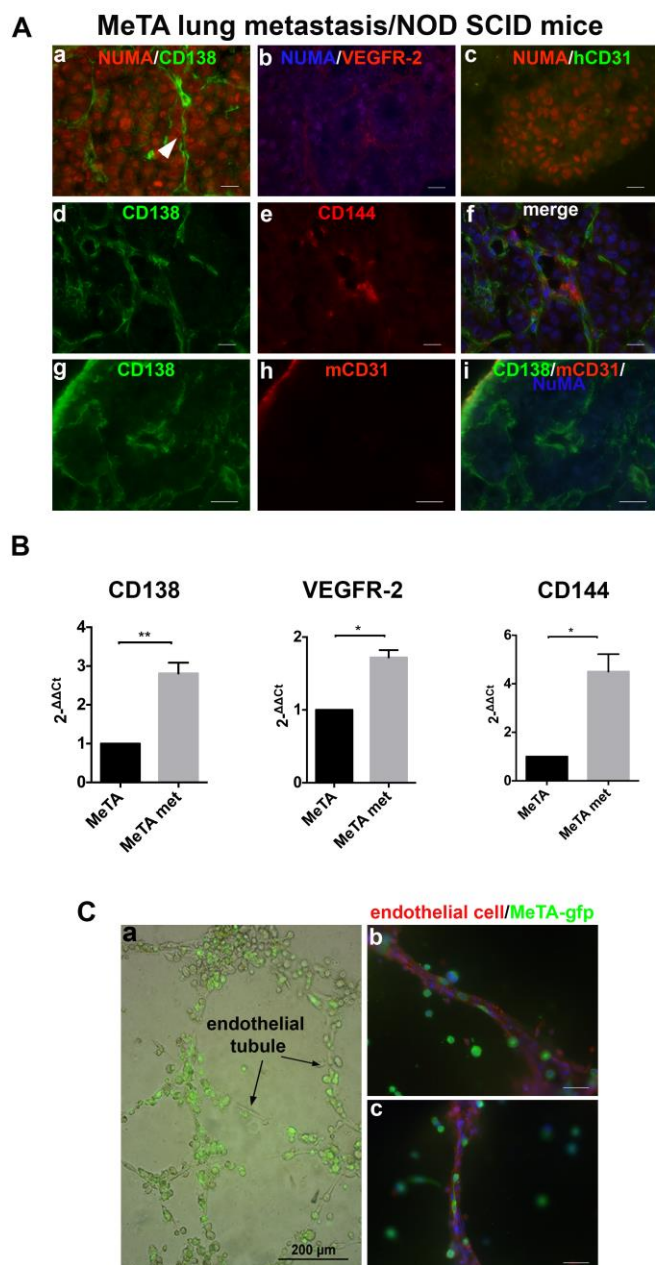


FIGURE 4

Figura 4. Espressione del sindecano-1 nelle metastasi polmonari. A, Immunofluorescenza di sezioni al criostato di metastasi polmonari indotte in topi NOD-SCID tramite iniezione in vena di cellule MeTA colorate in doppio con gli anticorpi anti-NuMA umano e OC-46F2, anti-VEGFR-2, anti-hCD31, anti-hCD144 e anti CD31 murino. Il pannello A (d-f) è controcolorato con il DAPI. Scale bars, 10µm. B, qRT-PCR del sindecano-1 umano, di VEGFR-2 e di CD144 nelle cellule umane di melanoma metastatico MeTA met in confronto con MeTA. $2^{-[\Delta][\Delta]Ct}$ è riportato nel grafico a colonne. *, **, indicano la differenza significativa e molto significativa tra i gruppi di cellule. C, Immagini in tempo reale della migrazione delle cellule MeTA-GFP lungo i tubuli endoteliali. Scale bars, 200µm (a). Colorazione in fluorescenza delle strutture tubulari cresciute su Matrigel utilizzando l' anticorpo anti-GFP per localizzare le cellule di melanoma e l' anticorpo anti-CD31 umano specifico per le cellule endoteliali (b-c). Scale bars, 50µm.

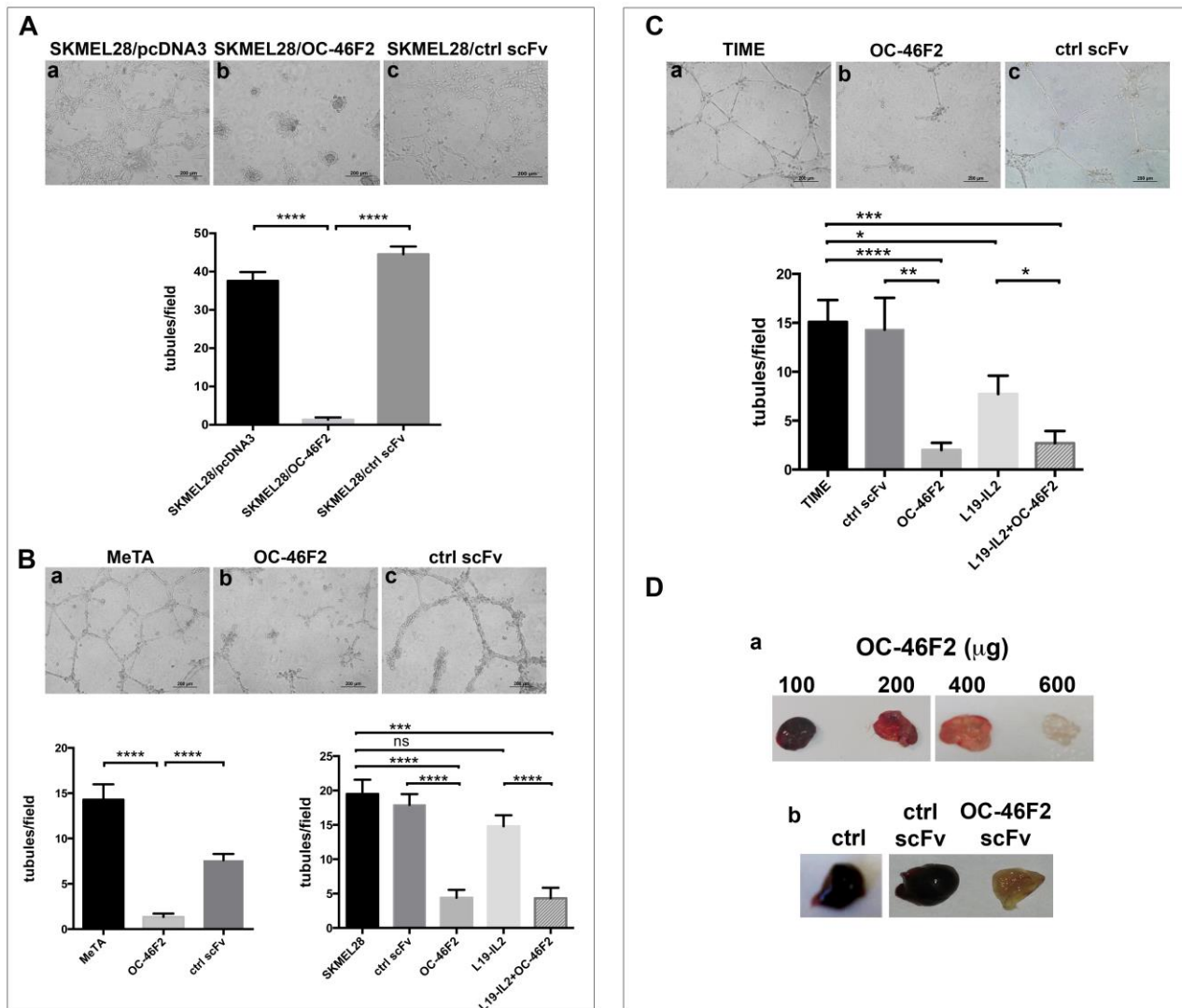


FIGURE 5

Figura 5. OC-46F2 inibisce la “vascular mimicry” e l’ angiogenesi. A, le cellule SKMEL28 transfettate in maniera stabile con OC-46F2 non sono in grado di formare strutture tubulari dopo 48 ore di incubazione su Matrigel (b) al contrario delle cellule transfettate con il vettore vuoto (a) o con l’ anticorpo scFv di controllo (c) che formano strutture ben organizzate. B, Formazione *in vitro* di strutture tubulari su Matrigel con le cellule di melanoma MeTA (a-c) o SKMEL28 in presenza di OC-46F2 e/o L19-IL2 in comparazione alle cellule trattate con scFv di controllo o non trattate. C, formazione *in vitro* di tubuli vascolari su Matrigel utilizzando le cellule endoteliali TIME (a-c) in presenza di OC-46F2 e/o L19-IL2 in confronto alle cellule trattate con scFv di controllo o non trattate. Il numero di tubuli formati in seguito ai differenti trattamenti è riportato nei grafici a colonna sotto gli esperimenti corrispondenti. I simboli qui di seguito elencati indicano le differenze statistiche tra i gruppi collegati dalle linee: ns, not significant; *, significant; **, very significant and ***, **** extremely significant. Scale bars, 200 μ m. La media \pm SE è riportata. D, Fotografie dei plugs espantati dai topi trattati con OC-46F2 in differenti quantità (a) e di plugs rappresentativi espantati da topi non trattati (n=6), trattati con scFv di controllo (n=6) o con OC-46F2 (n=6) (b).

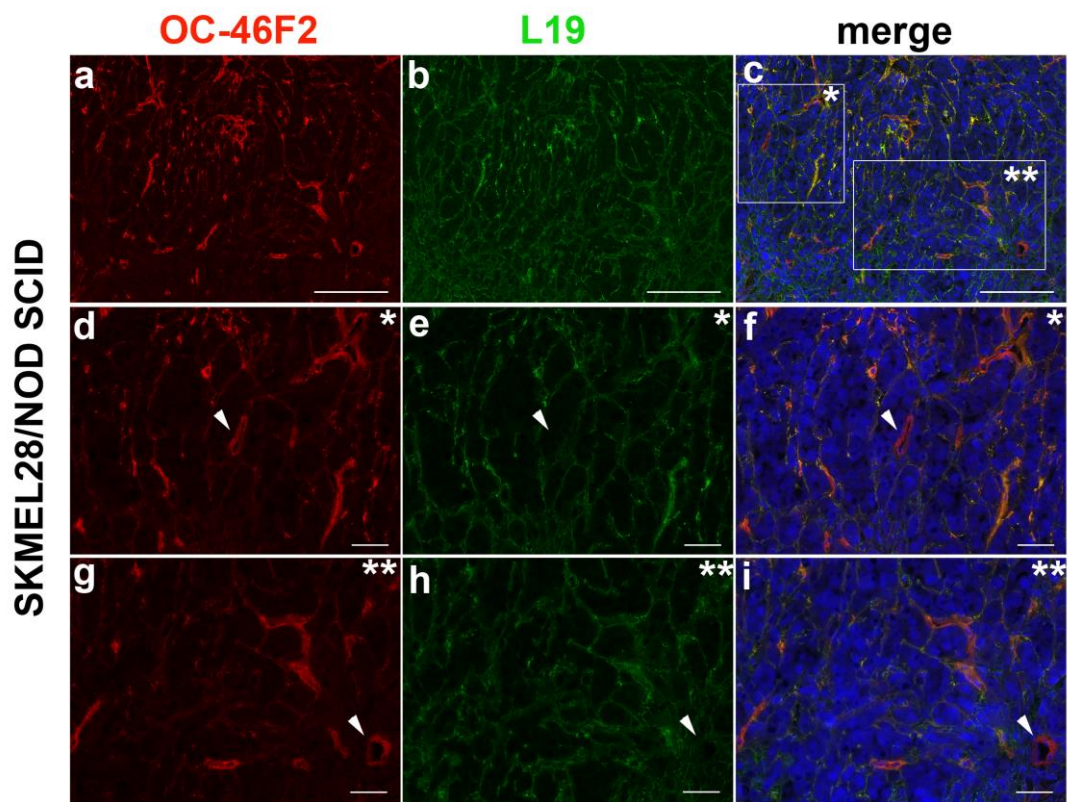


FIGURE 6

Figura 6. Espressione di sindecano-1 e B-FN. Immunofluorescenza di sezioni al criostato del melanoma SKMEL28 in topi NOD SCID colorate in doppio con gli anticorpi OC-46F2 (a) e L19 (b) e controcolorate con DAPI. In (c) è mostrata la co-distribuzione del Sindecano-1 con la B-fibronettina in molte strutture vascolari; negli ingrandimenti segnati con * e ** molti vasi sono positivi solo con OC-46F2 come indicato dalle teste di freccia bianche (d-f e g-i). Scale bars, 200 μ m (a-c) o 50 μ m (d-i).

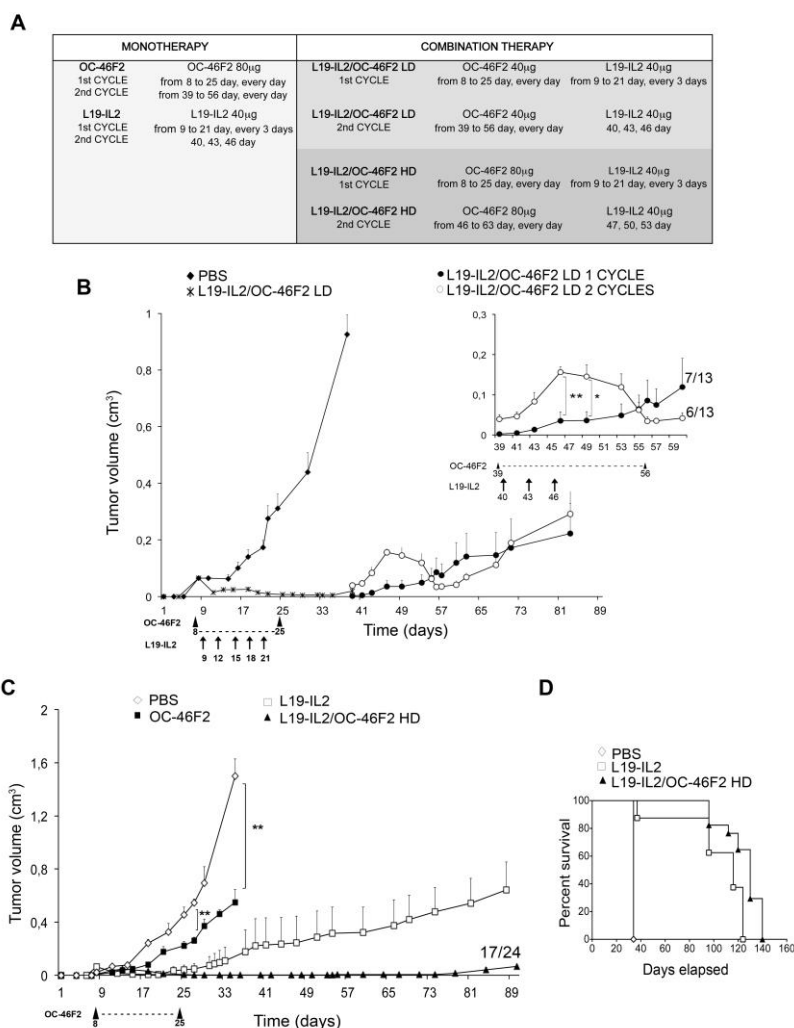


FIGURE 7

Figura 7. Il targeting del Sindecano-1 con scFv OC-46-F2 potenzia l' efficacia terapeutica dell' immunocitochina L19-IL2 nel melanoma. A, schema di somministrazione di OC-46F2 e L19-IL2 come trattamenti singoli o combinati. I giorni indicati sono quelli dall' impianto delle cellule sottocute. LD, Low Dose; HD, High Dose. Gli esperimenti di terapia combinata sono iniziati 8 giorni dall' impianto delle cellule di melanoma umano SKMEL28 in topi NOD SCID, quando i tumori erano palpabili. I topi sono stati suddivisi in maniera random in vari gruppi per i diversi trattamenti. B, Inibizione della crescita del tumore in topi (n=13) trattati con L19-IL2 e OC-46F2 low dose somministrati in combinazione per diciotto giorni. In alto a destra è mostrato un ingrandimento della curva di crescita dal giorno 39. Solo il 40% dei topi (n=6) è stato sottoposto a un secondo ciclo di terapia combinata con OC-46F2 somministrato tutti i giorni per 8 giorni e L19-IL2 somministrato nei giorni 40, 43, 46 come indicato dalle frecce. * e ** indicano rispettivamente differenze significative e molto significative ai giorni 46 e 49 tra il gruppo trattato con il secondo ciclo e il gruppo non trattato C, Inibizione della crescita del tumore nei topi (n=24) trattati con L19-IL2/OC-46F2 high dose somministrati in monoterapia o in combinazione ** indicano una differenza molto significativa tra il gruppo trattato con OC-46F2 e non trattato ai giorni 27 e 35. Dal giorno 32 la two-tailed p value del gruppo L19-IL2/OC-46F2 high dose messo in rapporto ai gruppi di topi trattati con OC-46F2 e L19-IL2 era rispettivamente estremamente significativa (p< 0.0001, ***) e molto significativa (p= 0.0037, **). Le medie dei volumi dei tumori \pm SE sono riportate. Le differenze statistiche sono state calcolate con il test nonparametrico Mann Whitney. D, curve di sopravvivenza versus giorni dei topi trattati con L19-IL2 in monoterapia, L19-IL2 e OC-46F2 HD in terapia combinata o non trattati. Le teste di freccia indicano i trattamenti con OC-46F2 somministrato ogni giorno. Le frecce indicano i trattamenti con L19-IL2.

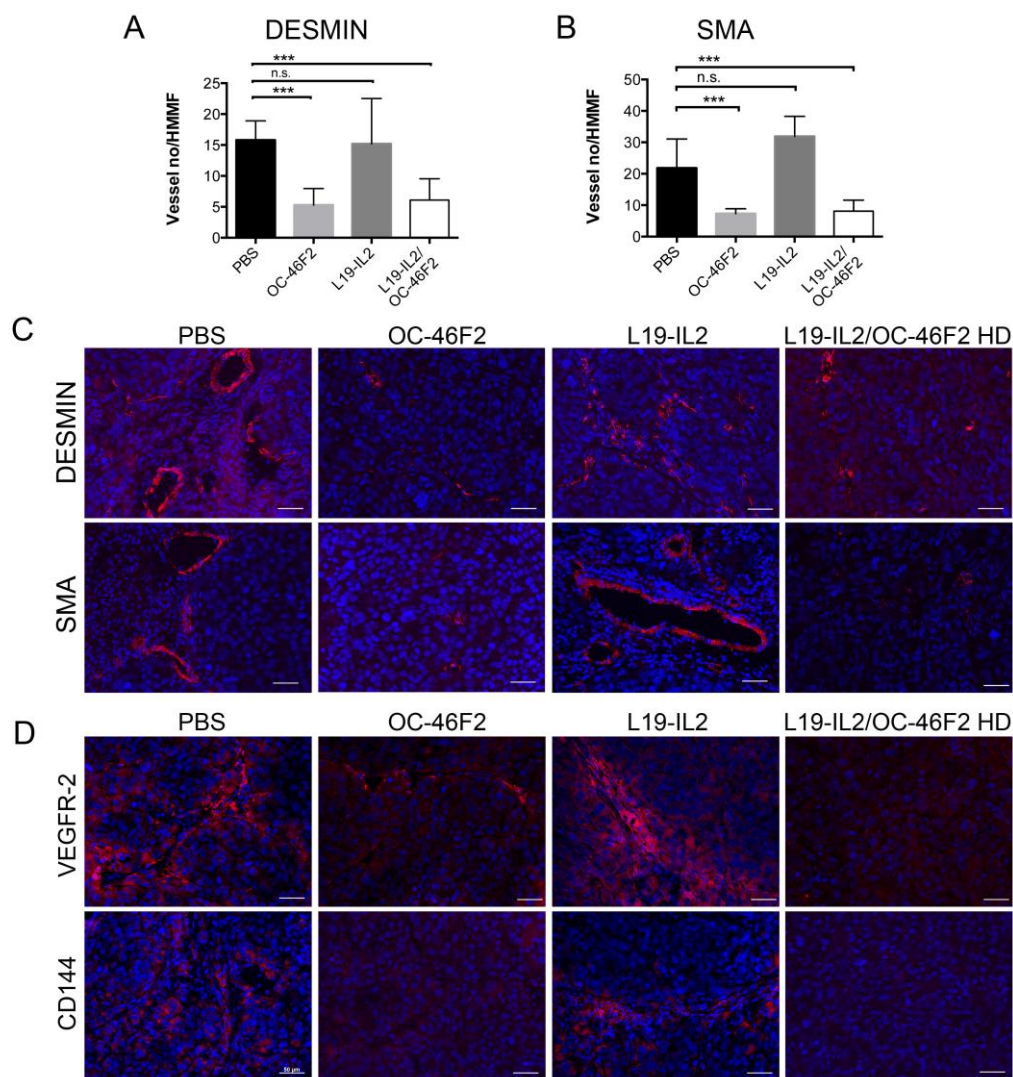


FIGURE 8

Figura 8. Il trattamento con OC-46F2 inibisce la maturazione vascolare e induce la perdita di strutture della VM. Quantificazione di (A) vasi immaturi (Desmina positivi) e (B) vasi maturi (SMA positivi) per HMMF nei tumori SKMEL-28 sottoposti ai vari trattamenti. La media \pm SE è riportata. *** indicano differenze estremamente significative tra i gruppi trattati con OC-46F2 o L19-IL2/OC-46F2 HD e non trattati. n.s. indica differenze non significative tra il gruppo trattato con L19-IL2 e non trattato. Analisi in immunofluorescenza di sezioni al criostato di tumori espuntati da topi SKMEL28/NOD SCID sottoposti a diversi tipi di trattamento colorate con gli anticorpi anti-desmina o anti-SMA (C) e anti-VEGFR-2 o anti-CD144 (D) come indicato in ogni figura e controcolorate con DAPI. Scale bars, 50 μ m.

Table 1. Human metastatic melanoma cells characteristics associated to VM

Cell lines	vasculogenic phenotype	human tumors xenografts/ NOD SCID mice	lung metastasis/ NOD SCID mice	c-Kit expression
SKMEL28	yes	yes	yes	no
MV3	yes	nd	yes	no
MeTA	yes	yes	yes	no
MeMO	yes	no	nd	no
MeMI	no	yes	no	yes
MePA	no	yes	yes	no
MeOV	no	yes	nd	no
MeCoP	no	yes	nd	yes
MeFeR	no	yes	nd	yes
MeBO	no	nd	nd	yes
MeTU	no	nd	nd	yes
MeDeBo	no	nd	nd	yes

Abbreviations: nd, not determined

FIGURE SUPPLEMENTARI

Figura supplementare S1

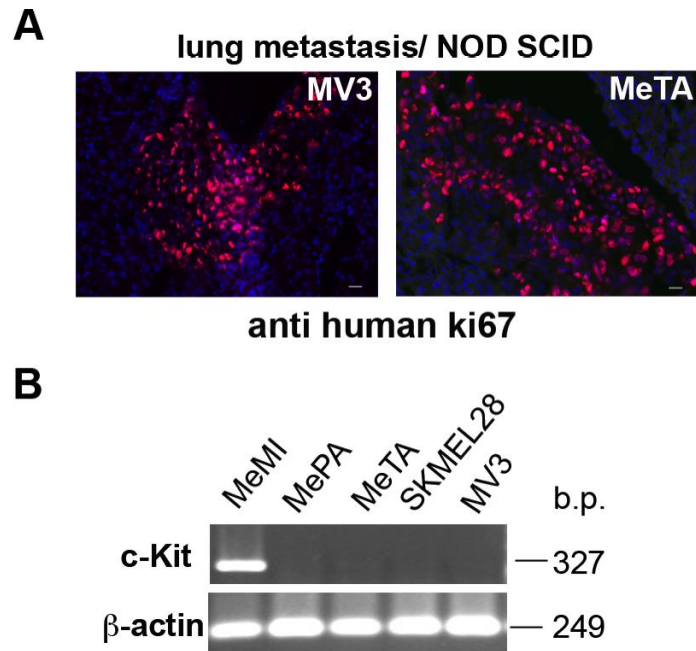


Figura supplementare S1. Capacità metastatica di cellule di melanoma. A, immunofluorescenza di sezioni al criostato di metastasi polmonari indotte tramite iniezione i.v. delle cellule MV3 o MeTA in topi NOD SCID, colorate con l' anticorpo anti ki67 umano e controcolorate con DAPI. Scale bars, 50 μ m. B, RT-PCR dell' espressione di c-Kit nelle cellule di melanoma MeMI, MePA, MeTA, SKMEL28 e MV3. La Beta-actina è stata usata come controllo positive. Base pairs (b.p.) dei geni umani sono riportate.

Figura supplementare S2

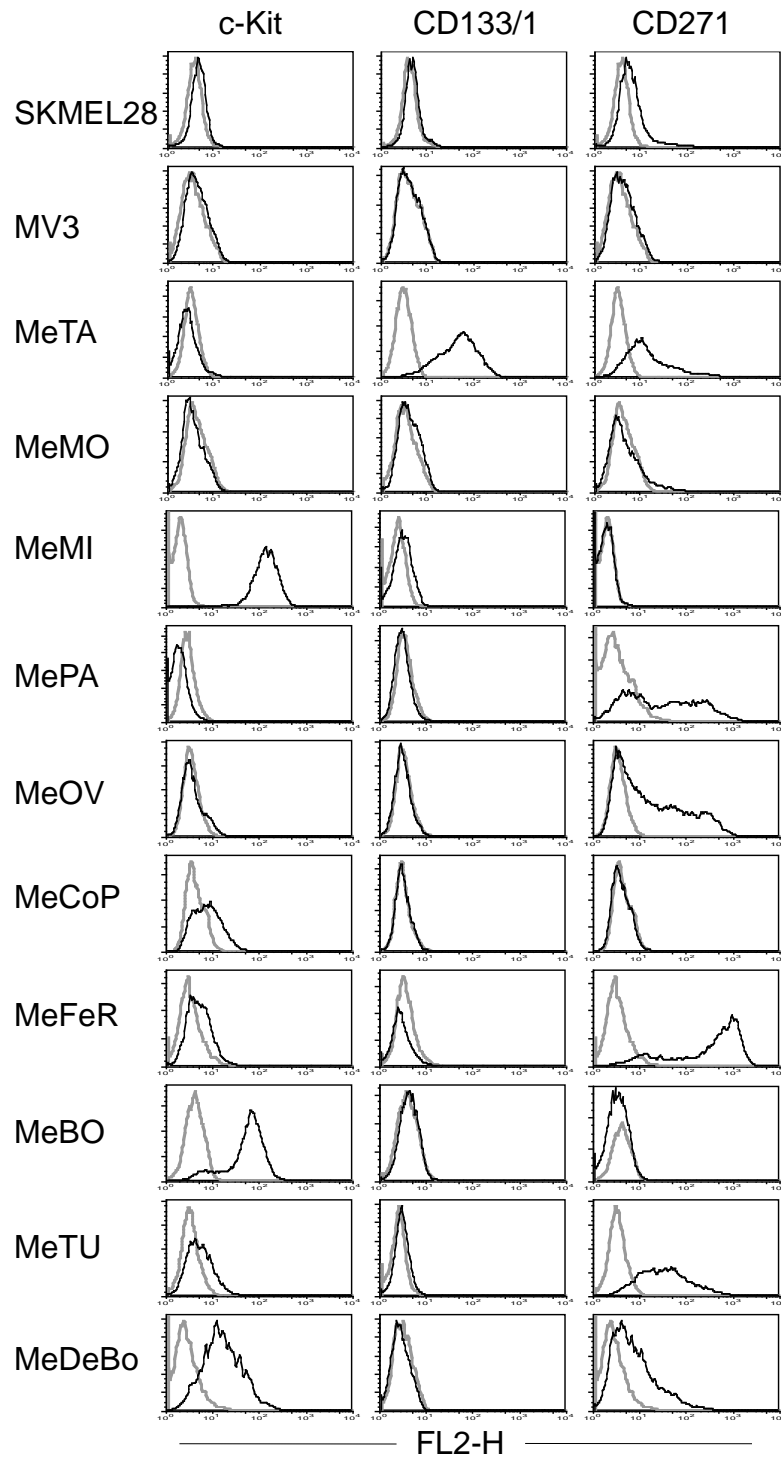


Figura supplementare S2. Analisi dell' espressione dei markers di staminalità c-Kit/CD117, CD133/1 e CD271 in cellule di melanoma. Per l' analisi in citofluorimetria sono stati usati gli anticorpi primari specifici per i marker di staminalità e l' anticorpo secondario PE-conjugated goat anti mouse isotipo-specifico. I profili grigi rappresentano i controlli negativi.

Figura supplementare S3

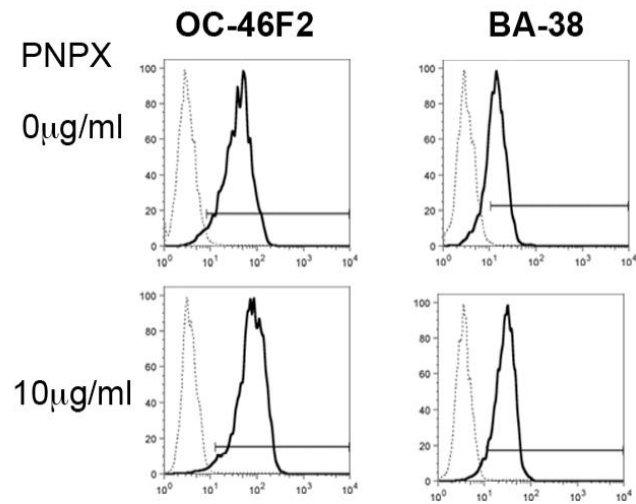


Figura supplementare S3. scFv OC-46F2 riconosce il core protein del sindecano-1. Analisi citofluorimetrica dell'espressione del sindecano-1 umano nelle cellule di melanoma umano MV3 non sottoposte o sottoposte tutta la notte al trattamento con 10 µg/ml PNPX (elongation inhibitor of protein-associated GAG) utilizzando l'anticorpo monoclonale commerciale B-A38 anti sindecano-1 e OC-46F2. Gli stessi risultati sono stati ottenuti utilizzando la linea di melanoma SKMEL-28. La linea nera tratteggiata è il controllo negativo.

Figura supplementare S4

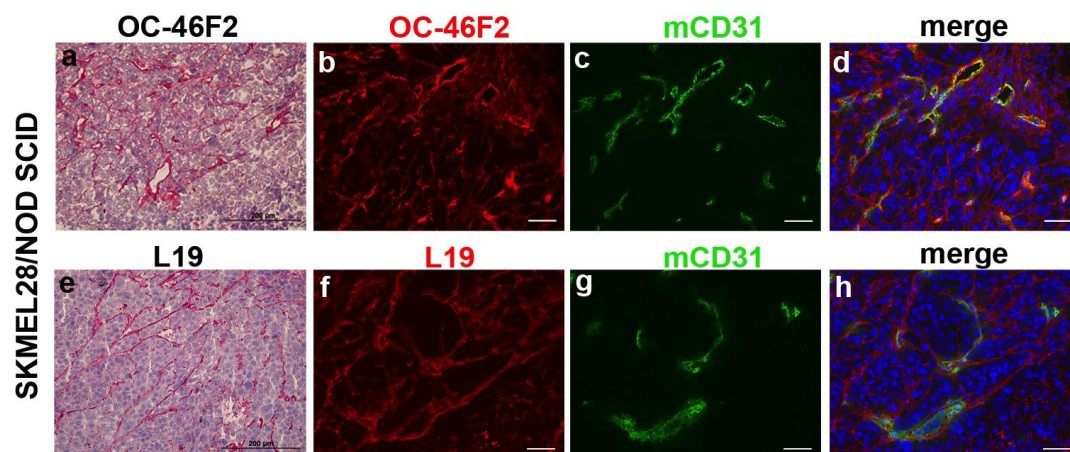


Figura supplementare S4. Espressione di sindecano-1 e B-Fibronettina in tessuti di melanoma.

Sono riportate le immunoistochimiche (a,e) e le immunofluorescenze (b-d, f-h) dei tumori SKMEL28 cresciuti in topi NOD SCID usando gli anticorpi scFv OC-46F2 anti sindecano-1 (a, b), L19 anti B-fibronettina, (e, f) e anti CD31 murino (c, g). Scale bars, 200μm (a,e) Scale bars, 50μm (b-d, f-h).

Figura supplementare S5

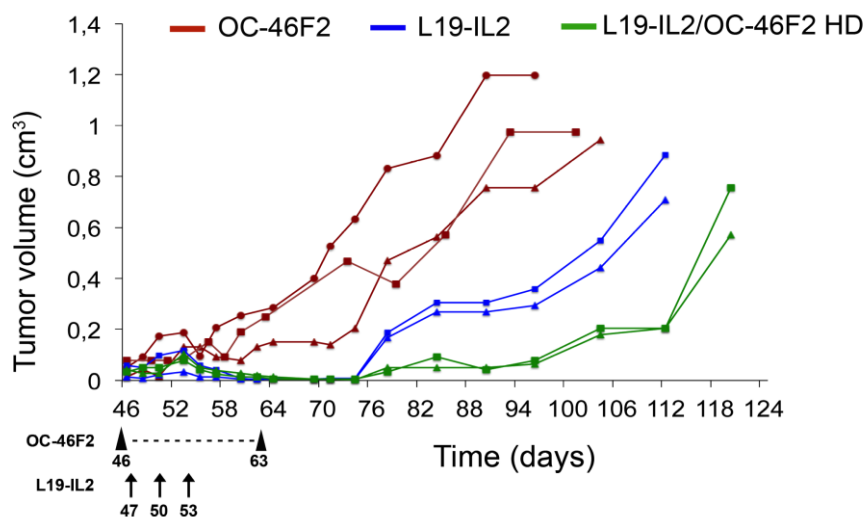


Figura supplementare S5. Inibizione della crescita tumorale nel gruppo L19-IL2/OC-46F2 HD che non ha risposto a terapia. Curve di crescita del tumore dal giorno 46 del gruppo L19-IL2/OC-46F2 HD che non ha risposto a terapia (n=7) sottoposto a tre differenti trattamenti come indicato in figura. Le teste di freccia indicano i trattamenti con OC-46F2 somministrato ogni giorno. Le frecce indicano i trattamenti con L19-IL2.

Figura supplementare S6

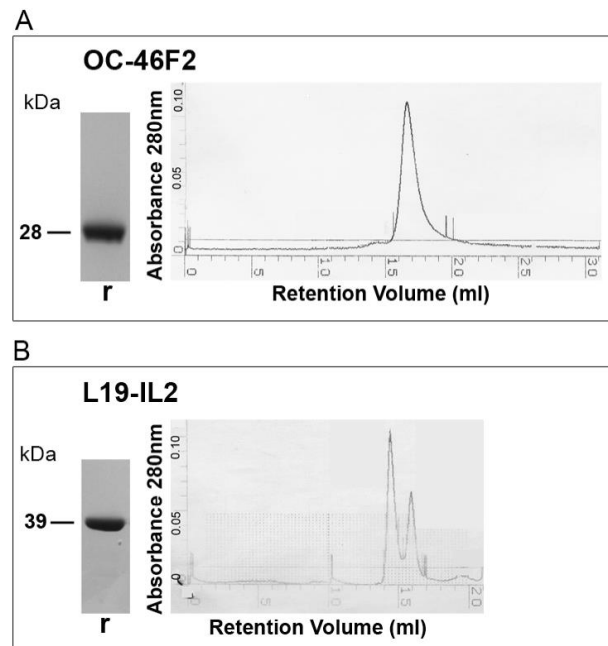


Figura supplementare S6. Anticorpo ricombinante umano e immunocitochina L19-IL2. SDS-PAGE analisi dell' anticorpo ricombinante umano purificato OC-46F2 (A, sinistra) e dell' immunocitochina L19-IL2 (B, sinistra) in condizioni riducenti (r); sono riportati i pesi molecolari delle proteine. "Size exclusion chromatography profiles" (Superdex 200) dell' anticorpo ricombinante umano purificato OC-46F2 (A, destra) e dell' immunocitochina L19-IL2 (B, destra) in condizioni native.

Table S1. Protein expression of endothelial and VM markers on endothelial and metastatic melanoma cells

Protein	TIME	MeMI	MePA	MeTA	SKMEL28
CD31	+	-	-	-	-
Syndecan1	+	+	+	+	+
CD144	+	+	+	+	+
VEGFR2	+	+	+	+	+

Table S2 Primers used for RT-PCR and qRT-PCR

Human gene	Primers sequence	Size (bp)
Syndecan-1	Fw: 5'-tcacctgtcacagcagacc-3' Rev: 5'-gttgaggcctgatgagtgg-3'	253
VEGFR2	Fw: 5'-gtggggattgacttcaactg-3' Rev: 5'-tgtgctgttcttcttggtca-3'	201
CD144	Fw: 5'-ttcatgacgtgaacgacaac-3' Rev: 5'-tccaccacgatctcatacct-3'	262
c-Kit	Fw: 5'-tgacttacgacaggctcgtg -3' Rev: 5'-aaggagtgaacagggtgtgg -3'	327
CD44	Fw: 5'-cctggatcacccgacagcacagaca-3' Rev: 5'-ttctgacgactcctgttcacca-3'	382
ALDH1	Fw: 5'-ttggaattcccggttggtta-3' Rev: 5'-tgtccaagtcggcatcag-3'	352
Nodal	Fw: 5'-cttctccttctgagccaacaagagg-3' Rev: 5'-ggtgacctgggacaaagtgacagtg-3'	202
beta-actin	Fw: 5'-actccatcatgaagtgtgacg-3' Rev: 5'-catactcctgcttgctgatcc-3'	249

Questa tesi di specializzazione è stata oggetto di pubblicazione sulla rivista:

Oncotarget, 2015 Vol. 6, No. 35

Targeting Syndecan-1, a molecule implicated in the process of vasculogenic mimicry, enhances the therapeutic efficacy of the L19-IL2 immunocytokine in human melanoma xenografts

Paola Orecchia^{1,3}, Romana Conte¹, Enrica Balza², Gabriella Pietra^{1,3}, Maria Cristina Mingari^{1,3} and Barbara Carnemolla¹

1 Laboratory of Immunology, IRCCS AOU San Martino-IST, Genoa, Italy

2 Laboratory of Cell Biology, IRCCS AOU San Martino-IST, Genoa, Italy

3 Department of Experimental Medicine, University of Genoa, Genoa, Italy